



## تأثیر تمرین هوازی با مصرف ملاتونین بر مارکرهای آپوپتوزی HSP70 و HSP60 در قلب

### موش صحرایی نر پس از ایسکمی-ریپرفیوژن

مسعود جوکار<sup>۱\*</sup>، پژمان معتمدی<sup>۲</sup>، محمد نبیونی<sup>۳</sup>، حمید رجبی<sup>۴</sup>، ندا خالدی<sup>۵</sup>

۱- دانشگاه خوارزمی- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزشی- دانشجوی دکتری.

۲- دانشگاه خوارزمی- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزشی- استادیار

۳- دانشگاه خوارزمی- دانشکده علوم زیستی- گروه سلولی و مولکولی- دانشیار.

۴- دانشگاه خوارزمی- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزشی- دانشیار.

۵- دانشگاه خوارزمی- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزشی- استادیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۷

### چکیده

**مقدمه:** هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر تمرین هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان مارکرهای HSP70 و HSP60 میوکارد رت پس از ایسکمی ریپرفیوژن می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** ۳۰ رت صحرایی نر ویستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند؛ موش‌ها به پنج گروه تقسیم شدند: گروه پایلوت (n=۴)، کنترل (n=۴)، ملاتونین (n=۴)، هوازی (n=۴) و هوازی ملاتونین (n=۴). رت‌های گروه‌های ملاتونین به مدت یک ماه هر روز با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند و رت‌های گروه‌های تمرین هوازی و تمرین هوازی ملاتونین تحت دوره تمرین یک ماهه با تواتر تمرین سه جلسه در هفته روی تردمیل قرار گرفتند. سپس تمام رت‌ها در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت تحت تزریق داروی ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند؛ در نهایت رت‌ها پس از تأیید سکنه تشریح شدند و اندازه‌گیری بیان ژن HSP70 و HSP60 به روش real-time PCR انجام شد. نتایج تحقیق با فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و روش آماری تی مستقل، تحلیل واریانس یک‌طرفه و کروسکال والیس تحلیل شد.

**نتایج:** نتایج مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن HSP70 در بین گروه‌های تجربی تفاوت معنی‌داری دارد ( $P \geq 0/05$ ) ولی بین گروه ملاتونین و گروه هوازی ملاتونین تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ( $P \geq 0/989$ ). همچنین میزان بیان ژن HSP60 نیز در گروه‌های تحقیق تغییرات معنی‌داری نداشته است ( $P \geq 0/297$ ).

**نتیجه‌گیری:** تیمار ملاتونین و تمرین هوازی به تنهایی بر بیان ژن HSP70 و HSP60 تأثیر ناچیزی دارند اما تمرین هوازی با مصرف ملاتونین می‌تواند بیان ژن HSP60 و HSP70 را به ترتیب افزایش و کاهش دهد.

### واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، تمرین هوازی، ملاتونین، HSP70، HSP60.

\*نویسنده مسئول: کرج- انتهای خیابان شهید بهشتی- میدان دانشگاه- کدپستی ۳۷۵۵۱-۳۱۹۷۹، تلفن: ۰۲۶-۳۴۵۷۹۶۲۷، نمابر: ۰۲۶-۳۴۵۷۹۶۲۷.

Email: Masoudjokar13@gmail.com

**ارجاع:** جوکار مسعود، معتمدی پژمان، نبیونی محمد، رجبی حمید، ندا خالدی. تأثیر تمرین هوازی با مصرف ملاتونین بر مارکرهای آپوپتوزی HSP70 و HSP60 در قلب موش صحرایی نر پس از ایسکمی-ریپرفیوژن. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۶؛ ۱۲(۱): ۷۳-۸۰.

## مقدمه

قبل از سال ۱۹۰۰ بیماری‌های عفونی و سوء تغذیه شایع‌ترین علل مرگ در جهان محسوب می‌شد؛ اما در حال حاضر بیماری‌های قلبی-عروقی (CVD) شایع‌ترین علت مرگ در بسیاری از نقاط جهان هستند. این تغییر که به آن گذار اپیدمیولوژیک اطلاق می‌شود ناشی از صنعتی شدن، شهرنشینی و تغییر سبک زندگی است که در همه نقاط جهان و در میان همه نژادها، گروه‌های قومی و فرهنگ‌ها در حال رخ دادن است. بر همین اساس پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۰، تعداد موارد مرگ و میر ناشی از بیماری عروق کرونری (CHD) مهم‌ترین علت مرگ و میر را به خود اختصاص دهد (۱).

هیپوکسی یا کمبود اکسیژن یکی از علل آسیب‌های سلول عضله قلب، و در نهایت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول قلبی به نام آپوپتوز است؛ به طوری که سلول‌ها و میتوکندری‌های آن ناحیه متورم شده و یکپارچگی غشاء خود را از دست می‌دهند و در نتیجه مواد داخل سلولی آزاد می‌شوند که سبب بروز واکنش‌های التهابی و تشدید آسیب اولیه می‌گردند. البته فرآیندهایی نیز وجود دارد که مهارکننده مرگ سلولی هستند و در نتیجه با تشکیل کمپلکس آپوپتوز مقابله می‌کنند (۳).

به هر حال عوامل متعددی می‌توانند شدت ضایعه عروق کرونری و آپوپتوز قلبی را تحت تأثیر قرار دهند که مهم‌ترین آنها فعالیت بدنی و عادات تغذیه‌ای می‌باشد. برای مثال خطر گسترش بیماری شریان کرونری در بزرگسالان آماده یا فعال در مقایسه با افراد غیرفعال ۳۰ تا ۴۰٪ کمتر است (۱). همچنین تحقیقی نشان داد فعالیت ورزشی، ریکاوری قلب سالخوردگان را بعد از ایسکمی عملکردی از طریق محدود کردن اکسیداسیون پروتئینی، افزایش سنتز نیتریک اکساید و HSP70 بهبود می‌بخشد (۴). از این رو می‌توان گفت برنامه ورزشی منظم، می‌تواند ظرفیت هوازی بیماران کرونری را بهبود بخشد چرا که باعث افزایش برون‌ده قلبی و برداشت محیطی اکسیژن می‌شود و مقاومت در برابر مرگ سلول را افزایش می‌دهد. البته مقادیر بیشتر فعالیت بدنی باعث فواید زیادتری می‌شود (۵). به عبارت دیگر افرادی که برنامه فعالیت بدنی منظم را به مدت طولانی و یا با شدت زیادتری حفظ می‌کنند، احتمالاً فواید بیشتری به دست می‌آورند تا افرادی که مقادیر فعالیت بدنی کمتری دارند (۶).

همچنین طی فعالیت بی‌هوازی شدید نسبت به حالت استراحت، انقباض پذیری بطن چپ به طور قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند. اما در فعالیت بی‌هوازی بیشینه، انقباض پذیری بطن چپ در مقایسه با مقادیر به دست آمده از فعالیت هوازی شدید بیشینه، به طور قابل توجهی بالاتر است؛ که تا حدودی به دلیل افزایش فشار خون سیستولی و دیاستولی و کاهش کمتر در مقاومت محیطی کل می‌باشد. البته کاهش کمتر در مقاومت محیطی کل، ناشی از افزایش غلظت مواد وازواکتیو است که به دلیل شرایط اسیدی و هیپوکسی بافتی رخ می‌دهد. بنابراین کاهش کمتر در مقاومت

محیطی کل و افزایش پس بار طی فعالیت بی‌هوازی بیشینه ممکن است بطن را مجبور به پمپاژ خون در مقابل یک فشار نسبتاً بالاتر کند (۵). لذا به نظر می‌رسد فعالیت بی‌هوازی همچون فعالیت هوازی بتواند پیش آماده‌ساز مناسبی برای حوادث قلبی باشد.

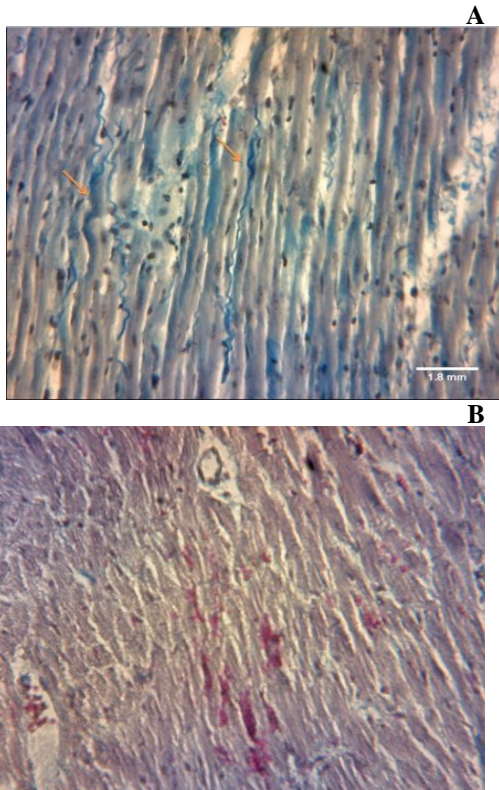
همچنین خطر ضایعه عروق کرونری در افرادی که رژیم غذایی مطلوب دارند کمتر است؛ زیرا تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف کم سبزی و میوه و همچنین سطح کلسترول بالا باعث از دست دادن سلامت و ایجاد میلیون‌ها مرگ قلبی می‌گردد (۱)؛ در همین راستا برخی تحقیقات جهت بهبود عادات تغذیه‌ای روبه مکمل‌های غذایی آورده‌اند؛ که از این میان می‌توان به مکمل ملاتونین جهت بهبود بیماری قلبی و عروقی در تحقیقات یاد کرد. زیرا ملاتونین که از غده صنوبری و هنگام خواب شب ترشح می‌شود از طریق کاهش تون سمپاتیک، تغییرات ریتمیک ضربان قلب، فشار خون و برون ده قلب در طی روز اثر محافظتی در مقابل آسیب ایسکمی دارد. به طوری که به نظر می‌رسد ملاتونین در کاهش نارسایی قلب ممکن است نقش داشته باشد. همچنین تحقیقات ملاتونین سطوح گردش خون پایین را در بیماران نارسایی قلب نشان داده‌اند، و ذکر کرده‌اند کاهش ملاتونین سبب تنگی عروق می‌شود (۷). به طوری که یک کاهش ۹۰ درصدی در قطر رگ باعث ایجاد محدودیت جریان خون حتی در حالت استراحت، که نیاز میوکارد به اکسیژن طبیعی می‌باشد، خواهد شد (۲). در نهایت این فرآیند منجر به ایسکمی یا هیپوکسی می‌گردد. در این راستا مطالعه‌ای بیان کرد عوامل آپوپتوزیس نظیر Bax و Bad با توجه به پیری افزایش می‌یابد، اما با درمان ملاتونین این شاخص‌ها معکوس می‌شود (۸). در تحقیقی نشان داده شد افزایش ملاتونین به سلول‌های پانکراس منجر به افزایش معنی‌دار HSP70 در این گروه از سلول‌ها شد (۹). در نهایت می‌توان گفت ملاتونین مقاومت سلول قلبی را در مقابل مرگ سلولی افزایش می‌دهد.

در مجموع اکثر منابع ذکر کرده‌اند درمان بیماران مبتلا به بیماری قلبی عروقی نظیر اصلاح عوامل خطر ساز و تغییر شیوه زندگی به منظور کند کردن یا متوقف ساختن روند پیشرفت آترواسکلروز و ترومبوز دارای اهمیت است، و دوماً درمان دارویی به منظور جلوگیری یا برطرف ساختن آنژین قلبی مهم است (۲). حال با توجه به اینکه در تحقیقات زیاد از ورزش و ملاتونین به عنوان دو عنصر آنتی‌آپوپتوزی یا ضد بیماری‌های قلبی یاد می‌شود؛ و از طرفی دیگر با افزایش سن از میزان تحرک بدنی و ترشح ملاتونین کاسته می‌شود؛ به طوری که بیشتر انفارکتوس میوکارد در افراد مسن‌تر از ۶۵ سال اتفاق می‌افتد؛ حال اثربخشی سبک زندگی فعال و مصرف ملاتونین بر پیش آماده‌سازی در برابر سکت قلبی جای مطالعه دارد؟

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۳۰ رت صحرایی نر ویستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند؛ گروه پایلوت (n=۱۴) به گروه سالم بدون القای ایزوپرنالین (n=۷) و گروه تحت القای

سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب ایجاد شده در ته میکروتیوب توسط یک میلی‌لیتر الکل ۷۵٪ به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت ۳۳ میکرولیتر آب تثبیت‌کننده RNA به رسوب در دمای ۵۵ تا ۶۰ اضافه شد تا RNA در آب حل شود. تهیه cDNA با استفاده از پروتکل کیت ویوانتیس (کد RTPL12، کشور مالزی) انجام گردید؛ ضمناً پرایمرهای بتا اکتینین (فوروارد CTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG و ریورز TGGTACGACCAGAGGCATACAG) و HSP60 (فوروارد CAATAACACAAATGAAGAGGCTGG و ریورز TACAGCATCAACAGCCAACATC) و HSP70 (فوروارد GGTCTCAAGGGCAAGATCAG و ریورز TTTCTCAGCCAGCGTGTTAG) با نرم‌افزار Primer3 طراحی و مورد استفاده قرار گرفتند (۲۰ و ۲۱).



شکل ۱- تصاویر رنگ‌آمیزی تری کروماتون

A: بطن چپ تحت القای ایزوپرنالین با بزرگ‌نمایی  $\times 40$

B: بطن چپ رت سالم با بزرگ‌نمایی  $\times 40$

به‌منظور آماده‌سازی مواد ریل تایم، ۴ لاندا cDNA از هر گروه تحقیق به چاهک‌های دستگاه ریل تایم ریخته شد؛ سپس ۶ لاندا از محلول مستر میکس (یک لاندا پرایمر فوروارد و ریورز و ۵ لاندا سایر گرین شرکت یکتا تجهیز با کد YT2551) مخلوط گردید. در ادامه

ایزوپرنالین ( $n=7$ ) تقسیم شدند. در ادامه رت‌های گروه ملاتونین ( $n=4$ ) به مدت یک ماه هر روز با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند؛ و رت‌های گروه هوازی ( $n=4$ ) به مدت یک هفته با دویدن بر روی تردمیل آشنا شدند و سپس تحت تمرین یک ماهه با تواتر تمرین سه جلسه در هفته قرار گرفتند (۱۰)؛ اما گروه تمرین هوازی ملاتونین ( $n=4$ ) علاوه بر تمرین تحت گاوآژ ملاتونین قرار گرفتند؛ و تا پایان ۴ هفته گروه کنترل ( $n=4$ ) همراه با بقیه گروه‌ها بود (جدول ۱). ملاتونین مورد استفاده از شرکت سیگما با کد کالای M5250 خریداری شد.

جدول ۱- پروتکل تمرین هوازی

مؤلفه تمرین	مراحل تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین هوازی	سرد کردن
زمان تمرین (دقیقه)		۶ دقیقه	۳۰ دقیقه	۶ دقیقه
سرعت (m/min)		۱۵ تا ۲۰	۲۳ تا ۲۵	۱۵ تا ۲۰
مسافت		۹۰ تا ۱۲۰ متر	۶۹۰ تا ۷۵۰ متر	۹۰ تا ۱۲۰ متر
شیب تردمیل (درجه)		صفر	۵ تا ۲۰ درجه	صفر

تمام رت‌ها پس از یک ماه تمرین به مدت دو روز متوالی استراحت کردند و با فاصله ۲۴ ساعت تحت تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند (۱۱). ایزوپرنالین مورد استفاده دارای کد I5627 از شرکت سیگما خریداری شد. در ادامه با تکنیک رنگ آمیزی تری کروماتون مشخص شد این مقدار تزریق دارو باعث سکتة در گروه پایلوت می‌گردد. زیرا آزمون تی مستقل نشان داد میزان فیبروز به‌دست آمده از نرم‌افزار Z در گروه رت‌های تحت القای ایزوپرنالین و سالم تفاوت معنی‌داری دارد. به‌طوری‌که فیبروز گروه ایسکمی ریپرفیوژن نسبت به گروه سالم از میانگین بیشتری برخوردار بود (جدول ۲)؛ لذا این نتایج نشان می‌دهند که تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در دو روز متوالی توانایی ایجاد فیبروز در قلب رت‌ها را دارد که نشان‌دهنده سکتة قلبی است (شکل ۱). RNA.

نمونه‌های بطن چپ به‌وسیله ازت مایع وهاون سنگی با روش استخراج دستی و پروتکل استاندارد تریازول (کد ET101، به شرکت Civic Bio science) استخراج شد. طبق این پروتکل به ازای هر ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بافت، یک میلی‌لیتر محلول تریازول به میکروتیوب حاوی بافت اضافه شد. در ادامه نمونه‌ها پس از یک روز از فریز خارج شدند و به اندازه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (کد ۱۰۲۴۴۵، شرکت مرک آلمان) به محلول مایع اضافه گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در ادامه محلول رویی پس از سانتریفیوژ برداشته شد و به همان اندازه ایزوپروپانول (کد ۱۰۹۶۳۴، شرکت مرک آلمان) به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها پس از یک شب در فریز منفی ۸۰ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

تحقیق تغییرات معنی‌داری نداشته است ( $P \geq 0/297$ )؛ به عبارت دیگر متغیرهای مستقل تحقیق یعنی تیمار ملاتونین و تمرین هوازی بر بیان ژن HSP60 تأثیر معنی‌داری نداشته‌اند.

جدول ۲- نتایج آزمون تی مستقل در میزان فیبروز در گروه پایلوت

شاخص آماری	تعداد	میانگین فیبروز	انحراف معیار	لون	P.V
ایسکمی ریبریژن سالم	۷	۱۰۷/۸۵	۱۱/۹۵	۰/۰۹۸	۰/۰۰
	۷	۲۴/۵۷	۱۷/۱۷		

جدول ۳- آزمون تحلیل واریانس برای مقایسه ژن‌های HSP60 و HSP70 در گروه‌های کنترل، ملاتونین، هوازی، هوازی ملاتونین

گروه‌های تحقیق	2-ΔΔCTHSP70	Fold change	انحراف استاندارد HSP70	Sig HSP70
کنترل	۰/۰۴۴۲۳۷۵			
	۲/۱۶۰۰۹۶۵۰	۱	۱/۰۷۶	
	۰/۱۲۴۲۳۰۸۸			
	۱/۶۷۱۴۴۴۸۶۳			
ملاتونین	۰/۷۱۷۵۲۳۳۹			
	۰/۴۲۹۶۰۸۸۹	۱/۴۴	۱/۳۱۴	
	۱/۲۹۳۳۳۴۷۸			
	۳/۳۴۲۸۸۹۷۲			
هوازی	۰/۵۶۲۹۵۶۶۶			۰/۹۸۹
	۰/۴۴۱۶۸۶۸۴	۱/۵۸	۲/۳۲۶	
	۰/۲۵۹۰۱۲۸۸			
	۵/۰۶۶۸۷۳۳۳۹			
هوازی ملاتونین	۰/۱۰۳۰۲۷۰۹			
	۰/۲۰۷۴۸۷۴۱	۱/۷۵	۲/۱۳۴	
	۲/۰۵۷۷۹۰۰۰			
	۴/۶۶۲۴۷۴۲۷			

جدول ۴- آزمون کراسکال والیس برای مقادیر بیان ژن HSP60 در گروه‌های تحقیق

متغیر تحقیق	گروه‌های تحقیق	تعداد گروه‌ها	رتبه‌بندی میانگین‌ها	انحراف استاندارد	P.V
2-ΔΔCTHSP60	کنترل	۴	۸/۵		
	ملاتونین	۴	۱۷/۲۵		
	هوازی	۴	۱۴/۷۵	۰/۸۴۳	۰/۲۹۷
	هوازی ملاتونین	۴	۸/۲۵		

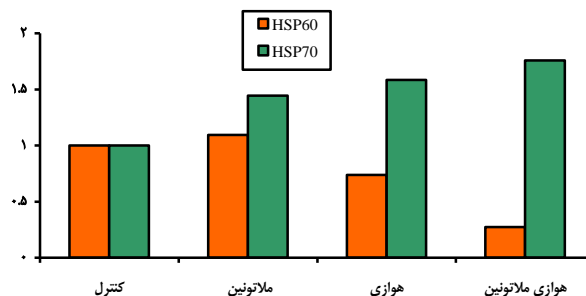
## بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مصرف ملاتونین میزان بیان ژن آپوپتوزی HSP60 و HSP70 را افزایش می‌دهد؛ اما این افزایش معنی‌دار گزارش نشد. نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات پیشین از نظر افزایش بیان HSP60 و HSP70 همسو است اما از نظر معنی‌داری

دستگاه ریل تایم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واشرشته شدن اولیه)، ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واشرشته شدن ثانویه)، ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها) و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (تکثیر) راه‌اندازی شد. واکنش از مرحله دوم به بعد برای ۴۰ سیکل تکرار شد. Ct‌های مربوطه به واکنش توسط نرم‌افزار دستگاه استخراج و ثبت شد.

## نتایج

نتایج چند برابری ژن‌های HSP60 و HSP70 نشان داد که میزان بیان ژن HSP60 در گروه ملاتونین، هوازی و هوازی ملاتونین نسبت به ایسکمی به ترتیب ۱/۰۹، ۰/۷۳ و ۰/۲۷ برابر شده است؛ در حالی که بیان ژن HSP70 در گروه ملاتونین، هوازی و هوازی ملاتونین به ترتیب ۱/۴، ۱/۵۸ و ۱/۷۵ برابر شده است (شکل ۲). این نتایج نشان دادند که مصرف ملاتونین در طول ۴ هفته چندان تغییری در بیان ژن‌های HSP60 و HSP70 ایجاد نکرده است، اما تمرین هوازی میزان بیان HSP60 و HSP70 را کاهش و افزایش داده است که این تغییرات در گروه هوازی ملاتونین چشمگیرتر بوده است.



شکل ۲- میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 در گروه‌های کنترل، ملاتونین، هوازی و هوازی ملاتونین

به‌منظور بررسی سطح معنی‌داری از مقادیر 2-ΔΔCT ژن‌های HSP60 و HSP70 استفاده شد؛ البته به دلیل اینکه واریانس داده‌های HSP60 و HSP70 به ترتیب با آزمون لون (levene) با  $P=0/017$  و  $P=0/669$  معنی‌دار و عدم معنی‌دار گزارش شدند؛ از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی برای ژن HSP70 و از آزمون کروسکال والیس برای ژن HSP60 به‌منظور مقایسه گروه‌های تحقیق استفاده گردید (جدول ۳ و ۴).

باتوجه به نتایج جدول ۳، میزان بیان ژن HSP70 در بین گروه‌های تجربی تغییر معنی‌داری داشته است. در ادامه آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بین گروه ملاتونین و گروه هوازی ملاتونین با آماره  $0/989$  تأثیر معنی‌داری وجود ندارد. به عبارت دیگر تیمار ملاتونین و تمرین هوازی بر بیان ژن HSP70 تأثیر معنی‌داری نداشته است. نتایج آزمون کروسکال والیس برای مقایسه بین گروه‌های تحقیق در بیان ژن HSP60 نشان داد که میزان بیان ژن HSP60 در گروه‌های

اکسیداتیو مشاهده می‌شود. به عبارت دیگر تولید زیاد رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها، سبب اختلال در ساختمان غشاء لیپیدها و دیگر ترکیبات سلولی می‌گردد. در پایان محققین نتیجه گرفتند که مصرف ملاتونین از تغییرات پروفایل‌های چربی و افزایش MDA ناشی از رژیم غذایی با فروکتوز بالا در بافت قلبی جلوگیری می‌کند (۱۴).

زیرا ملاتونین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان به‌علت دارا بودن ساختمان آروماتیک سرشار از الکترون، به‌طور مستقیم با رادیکال‌های آزاد ترکیب و به‌صورت یک محصول نهایی متابولیزه می‌شود. همچنین، این هورمون پس از عبور از غشای زیستی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را تحریک و ژن‌های پرواکسیدان را مهار می‌کند و به این ترتیب توان آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را بیشتر می‌نماید (۱۵).

دلیل دیگر افزایش ژن HSP70 احتمالاً کاهش آدرنالین و متعاقباً حفظ هومئوستاز کلسیم است که منجر به گشاد شدن عروق میوکارد می‌شود؛ در نتیجه منجر به حداقل اختلال و نفوذپذیری میتوکندری سلول می‌گردد؛ اما افزایش HSP70 نتوانسته است از رهاش HSP60 جلوگیری کند (۱۵).

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین هوازی و بی‌هوازی میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 را کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش در مقایسه با گروه ایسکمی رپرفیوژن معنی‌دار بیان نشد (سطح آماره HSP60 0.279 بیان شد). این نتایج از نظر اینکه میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 کاهش و افزایش داشته است با تحقیقات لی پگ و همکاران، ۲۰۱۰، جولینا و مارکوس، ۲۰۱۴ و شیرین بیان و همکاران، ۱۳۹۰ همسو است، اما از نظر معنی‌داری غیر همسو است. رت‌های پژوهش شیرین بیان و همکاران، گروه‌های ۱ و ۲ به مدت ۳ هفته (۵ جلسه در هفته) با سرعت ۱۷-۱۵ متر در دقیقه و مدت ۳۹-۲۵ دقیقه و گروه‌های ۳ و ۴ به مدت ۶ هفته با سرعت ۲۰-۱۵ متر در دقیقه و مدت ۵۴-۲۵ دقیقه تمرین کرده‌اند؛ در حالی که رت‌های تحقیق حاضر ۴ هفته و در هر هفته ۳ بار تمرین داده شدند. حال به‌نظر می‌رسد مدت تمرین به‌منظور سازگاری ویژگی‌های تمرین می‌تواند مفید باشد. اگر مدت زمان جلسات تمرین بیشتر شود و یا تواتر آن در هفته افزایش یابد بتوان بر میزان بیان مارکرهای HSP70 تأثیرگذار باشد. زیرا با سازگاری تمرین عوامل اکسیدانی، التهابی، پروفایل‌های چربی و در نهایت عوامل آپوپتوزی مانند کاسپاز ۳ کاهش می‌یابند در مقابل عوامل آنتی‌اکسیدانی، پیش بقای سلولی مانند مسیر-IGF1 R/PI3K/AKT افزایش می‌یابند که در مجموع می‌توانند آپوپتوز قلبی را کاهش دهند (۴، ۱۶ و ۱۷).

بنابراین به‌نظر می‌رسد با افزایش مدت تمرین ورزشی می‌توان عوامل پیش‌آپوپتوزی میوکارد را کاهش داد.

غیر همسو است. که این نتایج با یافته‌های تحقیق فورمن و همکاران در سال ۲۰۱۰ غیرهمسو است. زیرا این محققان اثرات مفید ملاتونین را بر تغییرات قلب رت‌های پیر بررسی کردند؛ در حالی که تحقیق حاضر از رت‌های ۲ تا ۳ ماهه استفاده کرده است؛ و به‌نظر می‌رسد که در تحقیق فورمن و همکاران ملاتونین بیشتر نقش آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال کرده است. در حالی که در تحقیق حاضر ملاتونین بیشتر نقش خواب‌آور و گشاینده عروقی را در رت‌های ۲ تا ۳ ماهه اعمال کرده است؛ به‌طوری که با خواب‌آوری و عدم‌تحرک و عمل گشادکنندگی عروق میزان نفوذ چربی در میوکارد را افزایش داده و در نهایت موجب می‌گردد میوکارد مستعد به آسیب ایسکمی شود. در تأیید این مطلب فورمن و همکاران بیان کردند پس از درمان با ملاتونین شاخص‌های التهابی، استرس اکسیداتیوی و آپوپتوزی در رت‌های مستعد به پیر نسبت به رت‌های جوان بیشتر معکوس شدند. حال به‌نظر می‌رسد ملاتونین با ویژگی‌های خود مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، گشادکننده عروق و خواب‌آوری می‌تواند نقش دوگانه ایفا کند؛ به‌طوری که اگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن غالب شود می‌تواند نقش مفیدی اعمال کند؛ اما در صورتی که نقش آن در گشادکردن عروق و خواب‌آوری آن غالب گردد می‌تواند نقش زیان‌آوری اعمال کند (۸).

از طرف دیگر نتایج تحقیق حاضر با تحقیق راسل و همکاران در سال ۲۰۰۹ وجه تمایز دیگری دارد و آن این است که در تحقیق حاضر ملاتونین به‌عنوان یک پیش‌آماده‌سازی معرفی شده است اما در تحقیق راسل و همکاران ملاتونین به‌عنوان یک دارو پس از ایسکمی رپرفیوژن دیده شده است. با توجه به اینکه پس از وقوع ایسکمی رپرفیوژن عوامل التهابی و اکسیدانی افزایش می‌یابد ملاتونین می‌تواند نقش آنتی‌اکسیدانی و پاک‌کنندگی مسمومیت‌های ایسکمی را انجام دهد و نقش مفید خود را اعمال کند. اما در تحقیق حاضر ملاتونین نتوانسته مفید واقع گردد؛ به‌طوری که با رسوب شاخص‌های لیپیدی مانند LDL و VLDL و متعاقباً افزایش عوامل التهابی و اکسیداتیوی، میوکارد را مستعد به آسیب بیشتر کرده است (۱۲).

از طرفی دیگر تحقیقی نشان داد که ملاتونین منجر به کاهش و افزایش VEGF و ROS در تخمدان می‌شود؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد تیمار ملاتونین در تحقیق حاضر میزان آنژیوژنز میوکارد را به‌دلیل عدم تحرک و کاهش سیر استرس کاهش داده است و از این طریق شاید بطن چپ رت‌ها را بیشتر مستعد به آسیب ایسکمی رپرفیوژن کرده است. زیرا میزان اکسیژن‌رسانی به میوکارد کاهش و از طرفی میزان نفوذ لیپیدها، مواد التهابی افزایش می‌یابد؛ به این دلایل میوکارد بیشتر مستعد به آسیب می‌گردد (۱۳).

از طرف دیگر سالاری لک و همکاران در سال ۱۳۹۰ بیان کردند که افزایش مقدار MDA در بافت‌های دارای نشانگر بروز استرس

## References

- Gudarzinezhad H, Khodaei M, editors. 18th ed. Self-assessment and board review. Tehran: Arjmand; 2012. [Persian].
- Farouni M, Arjmand M, editors. 2nd ed. Andreoli and carpenter's Cecil essentials of medicine. Tehran: Arjmand; 2011. [Persian].
- Sepehri H, Delfi L, editors. Rastgar a culture of animal cells. Tehran: Sina Teb & Rodegon; 2011. [Persian].
- Le Page C, Noirez P, Courty J, Riou B, Swynghedauw B, Besse S. Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart. *Exp Gerontol* 2009;44:177-82. doi:10.1016/j.exger.2008.10.003
- Daryanoush F, Mohazab M, editors. Exercise cardiopulmonary function in cardiac patients. Tehran: Hatmi; 2012. [Persian].
- Gaeini A, Samadi A, editors. ACSM guidelines for testing and prescribed exercise. Tehran: Hatmi; 2014. [Persian].
- Alizadeh MK, Garakyaraghi SM, TOOSi M, Ghasemi E, Khoshavi M, Salehi M, Hassan-Zadeh A. Effect of melatonin on left ventricular function in patients with heart failure. *Journal of Isfahan Medical School* 2011;29:1-7
- Forman K, Vara E, García C, Kireev R, Cuesta S, Acuña-Castroviejo D, et al. Beneficial effects of melatonin on cardiometabolic alterations in a murine model of accelerated aging. *J Pineal Res* 2010;49:312-20. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00800.x
- Bonior J, Jaworek J, Konturek SJ, Pawlik WW. Increase of heat shock protein gene expression by melatonin in ar42j cells. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2005;56:471-81.
- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14:753-60. doi:10.1097/HJR.0b013e3281eacef1
- Azami Jazi A, Hafezi MR, Cheraghi J, Abdi H. The Combined Effect of Endurance Training and Atorvastatin on the Extent of Necrosis Damage and Fibrosis Tissue in Male Wistar Rats Heart after Experimental Myocardial Infarction. *sjimu* 2016;23:28-38.
- Russel JR, Tan DX. Melatonin and cardiac pathophysiology. *Heart Metab* 2009;44:31-4.
- Li Y, Liu H, Sun J, Tian Y, Li CH. Effect of melatonin on the peripheral T lymphocyte cell cycle and levels of reactive oxygen species in patients with premature ovarian failure. *Exp Ther Med* 2016;12:3589-94. doi:10.3892/etm.2016.3833
- Salarilak L, Heydari R, Nejati V. The effect of melatonin in preventing changes in lipid profile and MDA production in the tissues. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2011;4:406-11. [Persian].
- Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin; multiplicity of mechanism from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005;27:119-30
- Borges JP, Lessa MA. Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. *Arq Bras Cardiol* 2015;105:71-81. doi:10.5935/abc.20150024
- ShirinBayan V, Roshan D, Soleyman V. Compare the effects of different drugs on the protection of aerobic exercise induced acute cardiotoxicity antitumor. 6th National Conference of Sports Science And Physical Education Students 2011. [Persian].
- Veneroso C, Tuñón MJ, González-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res* 2009;47:184-91. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00699.x
- KUMAR KV, NAIDU M. Effect of aral melatonin on exercise-induced oxidant stress in healthy subjects. *Indian Journal of Pharmacology* 2002;34:256-9.

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین هوازی و بی‌هوازی با مصرف ملاتونین میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 را به ترتیب کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش و افزایش در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن معنی‌دار نبود (سطح آماره به ترتیب برای ژن HSP60/۲۹۷ و در ژن HSP70/۹۸۹ بیان شد)؛ این نتایج نشان می‌دهد که تمرین هوازی و بی‌هوازی با مصرف ملاتونین توانسته است میزان بیان HSP60 را نسبت به سایر گروه‌ها به مقدار بیشتر کاهش دهد (۱۸).

در تأیید این مطلب کومار و همکاران در سال ۲۰۰۲ اثرات ملاتونین خوراکی و استرس اکسیداتیو ناشی از ورزش را در افراد سالم بررسی کردند. در این تحقیق به افراد سالم اجازه داده شد تا بر روی تردمیل به مدت ۱۲ دقیقه براساس پروتکل بروس بدونند. در حالی که سوپر اکسید دسموتاز و گلوکاتیبون پراکسیداز کاهش داشت. تغییری در فعالیت کل آنتی‌اکسیدان پلازما یا فعالیت کاتالاز در RBC پیش و پس از ورزش وجود نداشت. سطح پایه محصولات پراکسیداسیون لیپید در افراد تحت درمان با ملاتونین در مقایسه با مطالعه بدون ملاتونین به طور معنی‌داری کاهش داشت؛ همچنین کاهش سوپراکسید دسموتاز و گلوکاتیبون پراکسیداز ناشی از ورزش پس از درمان با ملاتونین جلوگیری شد (۱۹).

حال با توجه به یافته تحقیق حاضر و تحقیقات پیشین به نظر می‌رسد ملاتونین همراه با ورزش می‌تواند از اختلالات سیستم قلبی عروقی مانند افزایش رادیکال‌های آزاد، ROS، RNS، اکسیدان‌ها و عوامل آپوپتوزی مانند HSP60 جلوگیری کند و از طرف دیگر عوامل آنتی‌اکسیدانی را مانند سوپراکسید دسموتازها و گلوکاتیبون و همچنین عوامل آنتی‌آپوپتوزی را مانند HSP70 و پروتئین‌های شوک گرمایی مانند HSP72 و پروتئین‌های کانال‌های یونی مانند کلسیم و پتاسیم را افزایش دهد. از این رو توصیه می‌گردد با افزایش مدت زمان تمرین و تواتر تمرین در هفته همراه با مصرف ملاتونین بتوان از میزان حجم آپوپتوز احتمالی ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کاست.

حال با توجه به یافته تحقیق حاضر و تحقیقات پیشین به نظر می‌رسد ملاتونین همراه با ورزش می‌تواند از اختلالات سیستم قلبی عروقی مانند افزایش رادیکال‌های آزاد، ROS، RNS، اکسیدان‌ها و عوامل آپوپتوزی مانند HSP60 جلوگیری کند و از طرف دیگر عوامل آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دسموتازها، گلوکاتیبون و همچنین عوامل آنتی‌آپوپتوزی مانند HSP70 و پروتئین‌های شوک گرمایی مانند HSP72 و پروتئین‌های کانال‌های یونی مانند کلسیم و پتاسیم را افزایش دهد. از این رو این امکان وجود دارد با افزایش مدت زمان تمرین و تواتر تمرین در هفته همراه با مصرف ملاتونین بتوان از میزان حجم آپوپتوز ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کاست.

20. Shi j, He j, Lin j, Sun X, Sun F, Ou CH, et al. Distinct response of the hepatic transcriptome to Aflatoxin B<sub>1</sub> induced hepatocellular carcinogenesis and resistance in rats. *Sci Rep* 2016;6:1-9. doi:10.1038/srep31898
21. Yang B, Jain S, Ashra SY, Furness PN, Nicholson ML. Apoptosis and Caspase-3 in Long-Term Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats and Divergent Effects of Immunosuppressants. *Transplantation* 2006;81:1442-50. doi:10.1097/01.tp.0000209412.77312.69



## The Effect of Aerobic Exercise with Melatonin Consumption on the Expression of HSP60 and HSP70 Markers in Rat Myocard After Ischemic-Reperfusion

Masoud Jokar (Ph.D. Student)<sup>1\*</sup>, Pezhman Motamedi (Ph.D.)<sup>2</sup>, Mohammad Nabiuni (Ph.D.)<sup>3</sup>, Hamid Rajabi (Ph.D.)<sup>4</sup>, Neda Khaledi (Ph.D.)<sup>5</sup>

1- Dept. of Sport Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

2- Dept. of Sport Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

3- Dept. of Cell and Molecular Biology, School of Biological Sciences, Tehran, Iran.

4- Dept. of Sport Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

5- Dept. of Sport Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Received: 2 May 2017, Accepted: 17 June 2017

### Abstract:

**Introduction:** The aim of study was to examine the effect of aerobic exercise with melatonin consumption on the expression of HSP60 and HSP70 markers in rat myocard after ischemic-reperfusion by isoprenaline.

**Methods:** 30 male Wistar rats were used weighing approximately 200-250 g with two to three months old. Then the rats divided into five groups: pilot (n=4), control (n=4), melatonin (n=4), aerobic (n=4) and melatonin aerobic (n=4). Rats in melatonin group were gavaged every day for one month using a dose of 10 mg/kg BW. Meanwhile, rats in aerobic group and melatonin aerobic group were familiar with running on treadmill for one week, and then they were exposed training course with frequency of three times weekly for one month. After one month, all rats were injected isoprenaline with dose of 150 and 125 mg/kg BW with 24 hours in two consecutive days. Finally, rats were sacrificed after confirmation of infarct and expression of HSP60 and HSP70 gene were studied by real-time method. Data were analyzed with  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formula, one-way ANOVA and Kruskal Wallis methods.

**Results:** The results showed that there are significant differences in HSP70 gene expression between different groups ( $P \leq 0.05$ ) but there aren't significant differences in HSP70 gene expression between melatonin and melatonin aerobic groups ( $P \geq 0.669$ ). Also there aren't significant differences in HSP60 gene expression between different groups ( $P \geq 0.05$ ).

**Conclusion:** Melatonin treatment and aerobic training have negligible effect on HSP60 and HSP70 gene expression. In the other hand, aerobic exercise with consuming melatonin can decrease and increase HSP60 and HSP70 gene expression respectively.

**Keywords:** Apoptosis, Aerobic exercise, Melatonin, HSP60, HSP70.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: M. Jokar, Email: Masoudjokar13@gmail.com

**Citation:** Jokar M, Motamedi P, Nabiuni M, Rajabi H, Khaledi N. The effect of aerobic exercise with melatonin consumption on the expression of hsp60 and hsp70 markers in rat myocard after ischemic-reperfusion. Journal of Knowledge & Health 2017;12(1):73-80.